

## University of Groningen

### Resistance is Futile

Sibum, Imco

DOI:  
[10.33612/diss.143830475](https://doi.org/10.33612/diss.143830475)

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Sibum, I. (2020). *Resistance is Futile: The targeted delivery of antibiotics to the lungs*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.143830475>

#### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

#### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

A large, bold, orange letter 'A' serves as the background for the page. It is centered and occupies most of the vertical space.

# **APPENDICES**

## A.1 SUMMARY

Worldwide, tuberculosis (TB) is the number one deadliest infectious disease. The WHO reported that in 2018 a quarter of the world's population was latently infected, that 10 million people developed the active disease, and that 1.5 million people died as a result of it. Management of TB is made more difficult by the increasing incidence of pathogens resistant to treatment. Higher drug concentrations are required at the site of infection to counter resistance against antibiotics. However, the maximum dose that can be administered systemically for antibiotics is usually determined by their safety profile. Increasing the dose will likely result in more severe side effects. The local delivery of antibiotics by directly targeting the site of infection might be an answer to this. It would allow for higher local concentrations of antibiotics at the site of infection without increasing the systemic exposure and without increasing the incidence of side effects. Since TB is predominantly a pulmonary disease, delivery of antibiotics via the pulmonary route seems logical.

In **Chapter 2** the challenges for the delivery of high dose drugs via the pulmonary route are described. We have defined a high dose as a fine drug particle mass above 2.5 mg, in which the drug particles may include drug-excipient compounded particles (e.g. proteins stabilized in sugar glasses). This is based on current marketed dry powder inhalers (DPIs), which can contain between 10 and 25 mg of powder, and on the amount of drug adhesive mixtures can contain, which is around 5 to 10%. Adhesive mixtures are the formulation technique predominantly used for low drug doses. It is ill-advised to formulate doses above 2.5 mg

in adhesive mixtures. The definition of a high dose is established around DPIs as we consider other devices inappropriate for the delivery of high dose drugs.

Powders need to meet certain criteria to be suitable for pulmonary administration. The aerodynamic particle size distribution should be between 1 and 5  $\mu\text{m}$ , preferably between 1 and 3  $\mu\text{m}$ , to enable central and deep lung deposition. Preferably aerosolization of the powder should take place in the first 0.5 to 1.5 liters of air, and inhaler retention should be low. They should be paired with suitable DPIs. Several techniques are developed to prepare powders for pulmonary administration, such as milling, spray-drying, supercritical fluid technology, and particle replication in non-wetting templates (PRINT).

While minimizing the excipient content is paramount in high dose formulations, excipients may sometimes be desired. This could for example be the case when simply changing the processes used to produce the powders, or the process parameters, does not result in the required product characteristics. Some reasons why excipients may be required is for:

- *stabilizing biopharmaceuticals and vaccines;*
- *increasing drug solubility;*
- *decreasing or increasing (the rate of) moisture uptake;*
- *targeting macrophages or avoiding clearance by them;*
- *increasing muco-adhesion;*
- *adding a delayed or controlled release profile;*
- *improving the dispersion of the powder.*

Important considerations for DPI design are the dose compartment and dispersion principle of the inhaler, which should allow for aerosol delivery at low flow rates, deliver the aerosol in the first 0.5 to 1.5 L of air, deliver the aerosol with an aerodynamic particle size distribution between 1 and 5  $\mu\text{m}$ , preferably 1 and 3  $\mu\text{m}$ , and deliver more fine particles at higher flow rates to compensate for an increase in throat deposition. Furthermore, DPIs should be disposable when reinfection is an option, and DPIs should be designed in conjunction with their formulation to achieve the most optimal product while minimizing the excipients needed.

Air classifiers are likely a good option as dispersion principle, single dose compartments are superior to dose compartments containing multiple doses. For these dose compartments good flowability is required for the dose metering system to work. However, high dose formulations are rarely free flowing. Furthermore, blisters or capsules are suboptimal single dose compartments. They require high flow rates to empty the dose in the short time of inhalation. Single dose cartridges (SDCs) are likely a better option. They expose more surface to the airstream when the lidding foil is removed, improving entrainment and entrainment speed of cohesive powders.

In **Chapter 3** the first steps of formulating isoniazid for high dose pulmonary delivery are described. Two techniques are evaluated for the preparation of the powders, jet-milling and spray-drying. Jet-milled isoniazid without the use of excipients results in a poor formulation, over half of the Twincer® DPIs block with nominal doses of just 25 mg. Isoniazid shows an unusual morphology after milling, which was deemed the cause of these poor results.

The unexpected morphology is probably caused by local increases in temperature during milling, which sublimates part of the isoniazid particles. We found that isoniazid starts to sublime at 80 °C. Sublimated isoniazid deposits and fuses particles together when the temperature decreases again. Adding a lubricant to isoniazid should lower the local increases in temperature. Magnesium stearate is a well-known lubricant, and indeed decreases the incidence of blockages in a concentration dependent matter. Morphology is now as expected. Unfortunately, due to the magnesium stearate quantities required it is an unsuitable excipient. L-leucine has also been used for lubrication, but combined with isoniazid it does not perform as well as magnesium stearate.

Spray-dried isoniazid without excipients results in particles too large for pulmonary administration. Powders are found to be completely crystalline right after spray-drying. Particles measured in the airstream during the spray-drying process do show the particle sizes expected. It is thus likely that particle fusion occurs when the particles are in the collector where the particles are in contact with each other during crystallization.

The addition of 5% L-leucine (w/w) prevents particle fusion, the formed particles are suitable for pulmonary administration. Furthermore 50 mg of this formulation fits in the SDC, doubling the nominal dose. L-leucine is known to enrich at the surface of droplets during spray-drying, where it forms a coating when the droplets dry to particles. This L-leucine coating prevents the isoniazid cores from interacting with each other during crystallization. Stability is poor however. When exposed to moisture, particles again fuse together. This is likely caused by dissolution-crystallization.

In an effort to increase the stability of the formulation from chapter 3 the required leucine coating is optimized in **Chapter 4**. Leucine is known to provide moisture protection and thus could possibly prevent or delay dissolution-crystallization. Improving the coating was based on optimizing the excipient content needed, on optimizing the spray-drying parameters, and on optimizing the excipient used itself. As minimizing the excipient content is paramount for high dose drugs, optimizing the excipient content was aimed at lowering it, even though an increase may result in increased stability. Optimizing the spray-drying conditions has a considerable impact on the L-leucine coating. Particles suitable for inhalation are only found at inlet temperatures of 120 °C and above. However, no improvement in stability is seen.

Changing to trileucine as excipient improves the stability considerably. Powders can be stored for at least three months, even when exposed to a relative humidity of 75%. As a result of the physicochemical properties of trileucine it results in an improved coating. However, this does not explain the improvements seen in stability. Isoniazid with trileucine samples that have a poorer coating than isoniazid with L-leucine samples still have superior stability. This is likely the result of a difference in solid state of trileucine and L-leucine. L-leucine separates in a crystal, while trileucine separates amorphously. How this fact exactly translates to the results described remains unclear.

The formulation of isoniazid with 3% trileucine (w/w) disperses well from the Twincer® DPI, but retention is high and poorly reproducible. A different inhaler design, named the Cyclops®, maintains dispersibility but lowers the retention substantially and makes it more consistent. Due to trileucine the nominal dose can be further increased from 50 mg to 80 mg.

Thus far all inhaler measurements have been performed with hand-filled single dose cartridges (SDCs). **Chapter 5** describes the suitability of a vacuum drum filler for the automatic filling of SDCs. We have shown that the optimal isoniazid formulation, and an amikacin formulation, can be accurately and precisely dosed with the Omnidose vacuum drum filler. Automatic filling of amikacin needs to take place in a dry environment to be reproducible, as otherwise agglomerates form in the powder bed. The dispersability of the automatically filled SDCs is similar to those filled by hand while the retention decreases.

Dispersion should take place in the first 0.5 to 1.5 liters of air. For amikacin this takes place in the first 0.9 to 0.6 liters of air with a nominal dose of 57 mg at 4 and 6 kPa. Isoniazid, with a nominal dose of 55 mg, is dispersed considerably faster. At both 4 and 6 kPa the dose is dispersed in 0.18 liters of air. Because of this it is likely that higher nominal doses can be dispersed within the first 0.5 to 1.5 liters of air as well. The highest nominal dose tested, in an enlarged SDC, is 150 mg. This results in a fine particle dose of  $107.35 \pm 13.52$  mg. It is dispersed in 0.39 liters of air. Thus, automatic filling can be done in a reproducible and accurate manner, it increases dose emission, and higher nominal doses can be dispersed.

In **Chapter 6** an immunoassay for the determination of amikacin concentrations in serum is optimized for use with an upcoming clinical trial. Due to local targeting of drugs via the pulmonary route lower serum concentrations are expected. The standard assay has a lower limit of quantification (LLOQ) of 2.0 mg/L, which is likely too high for the determination of amikacin serum levels after inhalation. To lower the LLOQ and increase the sensitivity of the assay the sample volume



is increased from 3  $\mu\text{L}$  to 35  $\mu\text{L}$ . Furthermore, reagent volumes for reagents R1 and R2 are lowered from 250  $\mu\text{L}$  and 70  $\mu\text{L}$  to 95  $\mu\text{L}$  and 30  $\mu\text{L}$ , respectively. This method is calibrated and validated according to the HPLC requirements of the EMA and FDA guidelines. Validation samples with concentrations of 0.05 mg/L, 0.20 mg/L, 0.45 mg/L, 0.90 mg/L, and 1.35 mg/L all have bias, overall coefficient of variations (CVs), between-run CVs and within-run CVs within the requirements. The validation sample of 0.03 mg/L has overall CV, between-run CV, and within-run CV outside of the specifications, as a result the LLOQ is determined to be 0.05 mg/L. Additional validation of the assay regarding hemolytic, icteric, and lipaemic serum as well as the cross-reactivity of this assay to other TB antibiotics needs to be performed to determine its robustness.



*Appendix: Summary*

## A.2 / **SAMENVATTING**

Tuberculose (TB) is wereldwijd de meest dodelijke infectieziekte. Volgens de WHO was in 2018 een kwart van de wereldbevolking latent geïnfecteerd, kregen 10 miljoen mensen symptomen en stierven er 1,5 miljoen mensen aan de ziekte. Het behandelen van TB wordt bemoeilijkt door de toenemende incidentie van resistente varianten. Hogere geneesmiddelenconcentraties zijn nodig op de plek van infectie om resistentie te kunnen doorbreken. De maximale dosis van antibiotica dat systemisch kan worden toegediend, wordt meestal bepaald door hun veiligheidsprofiel. Een hogere dosis geven resulteert waarschijnlijk in zwaardere bijwerkingen. Een mogelijke oplossing is het lokaal toedienen van antibiotica op de plek van infectie. Dit staat hogere concentraties op de plek van infectie toe zonder de systemische blootstelling te verhogen en dus zonder het verzwaren van de bijwerkingen. Gezien TB voornamelijk een pulmonaire ziekte is, is het toedienen van antibiotica via de pulmonaire route logisch.

In **Hoofdstuk 2** zijn de uitdagingen voor het toedienen van hoog gedoseerde farmaca via de pulmonaire route beschreven. We hebben hoge doses gedefinieerd als: een fijne farmaca deeltjes massa boven de 2,5 mg, waarbij de deeltjes ook uit samengestelde farmaca-hulpstof deeltjes kunnen bestaan (bijvoorbeeld eiwitten gestabiliseerd in suikerglazen). Dit is gebaseerd op huidige droogpoederinhalatoren (DPIs), die tussen 10 en 25 mg aan poeder kunnen bevatten en op de hoeveelheid farmaca die in adhesieve mengsels geformuleerd kunnen worden, wat tussen de 5 en 10% is. Adhesieve mengsels is een formulering techniek die voornamelijk gebruikt wordt bij lage doseringen. Het is af te raden om doses boven de 2,5 mg in adhesieve mengsels te formuleren. Deze definitie is gebaseerd op DPIs omdat we andere inhalatoren

ongeschikt achten voor het toedienen van hoog gedoseerde farmaca.

Poeders moeten voldoen aan zekere criteria om geschikt te zijn voor pulmonaire toediening. De aerodynamische deeltjesgrootte verdeling moet tussen de 1 en 5  $\mu\text{m}$  zijn en het liefst tussen de 1 en de 3  $\mu\text{m}$ , om de centrale en perifere luchtwegen te kunnen bereiken. Aerosolisatie vindt het liefst plaats in de eerste 0,5 tot 1,5 liter aan geïnhalede lucht, en de inhalator retentie is laag. Verder moeten de poeders gekoppeld worden aan geschikte inhalatoren. Meerdere technieken zijn ontwikkeld voor de productie van poeders voor inhalatie, namelijk: malen, sproeidrogen, superkritische vloeistof technologie en 'particle replication in non-wetting templates (PRINT)'.

Hoewel het minimaliseren van de hoeveelheid hulpstof essentieel is voor hoog gedoseerde farmaca, zijn hulpstoffen soms gewenst. Bijvoorbeeld wanneer het veranderen van processen of het veranderen van proces parameters niet resulteert in het gewenste product. Een paar redenen waarom hulpstoffen nodig kunnen zijn, is voor:

- *het stabiliseren van biologicals en vaccins;*
- *het verhogen van de oplosbaarheid;*
- *het verlagen of verhogen (van de snelheid) van vocht opname;*
- *om gerichte opname door macrofagen te bevorderen of af te remmen;*
- *het verhogen van de muco-adhesie;*
- *het toevoegen van een vertraagde afgifte of gecontroleerde afgifte profiel;*
- *het verhogen van het dispersievermogen van het poeder.*

Belangrijke overwegingen voor een DPI ontwerp zijn het doseercompartiment en het disperseerprincipe, die geschikt moeten zijn om het poeder te dispergeren bij een lage stroomsnelheid. Verder moet het doseercompartiment en het disperseerprincipe geschikt zijn om de aerosol af te geven in de eerste 0,5 tot 1,5 liter lucht, om het poeder te dispergeren met een aerodynamische diameter tussen de 1 en 5  $\mu\text{m}$ , het liefste 1 en 3  $\mu\text{m}$ , en om meer fijne deeltjes afgeven bij hogere stroomsnelheden om te compenseren voor de toename in keeldepositie. Verder moet de inhalator weggeworpen kunnen worden wanneer herinfectie een mogelijkheid is en de inhalator moet samen met de formulering ontwikkeld worden om zo tot een optimaal product te komen met een minimaal gebruik van hulpstoffen.

Air-classifiers zijn waarschijnlijk een goede optie als disperseerprincipe en doseercompartimenten met een enkele dosis zijn superieur tegenover doseercompartimenten die meerdere doses bevatten. Om doseercompartimenten met meerdere doses te laten functioneren, zijn goede stroomeigenschappen van het poeder belangrijk. Dat komt alleen weinig voor bij hoog gedoseerde farmaca. Verder zijn blisters of capsules niet optimaal als doseercompartiment met een enkele dosis. Hoge stroomsnelheden zijn nodig om deze te legen in een korte tijd. Cartridges met een enkele dosis zijn een betere optie. Ze stellen meer oppervlak bloot aan de luchtstroom, wat het meevoeren van het poeder door de lucht en de snelheid daarvan positief beïnvloed.

In **Hoofdstuk 3** zijn de eerste stappen voor het formuleren van isoniazide voor hoog gedoseerde pulmonaire toediening beschreven. Er worden twee technieken voor het produceren van de poeders

geëvalueerd, namelijk straal-malen en sproeidrogen. Gemalen isoniazide zonder hulpstoffen resulteert in een slechte formulering, meer dan de helft van de Twincer® inhalatoren blokkeren met een nominale dosis van slechts 25 mg. De morfologie van isoniazide na het malen is ongebruikelijk, wat als de oorzaak van de slechte resultaten wordt gezien.

De ongebruikelijke morfologie wordt waarschijnlijk veroorzaakt door lokale toenames in temperatuur tijdens het malen, wat een deel van de isoniazide deeltjes sublimeert. We ontdekten dat isoniazide vanaf 80 °C begint te sublimeren. Gesublimeerd isoniazide slaat neer en fuseert deeltjes samen wanneer de temperatuur weer afneemt. Het toevoegen van een glijmiddel zou de lokale toenames in temperatuur moeten verlagen. Magnesium stearate is een bekend glijmiddel en verlaagt de hoeveelheid blokkeringen in de inhalator in een concentratie afhankelijke manier. De morfologie is nu ook zoals verwacht. Helaas is magnesium stearate geen bruikbare hulpstof door de hoeveelheden die nodig zijn om het gewenste resultaat te bereiken. L-leucine wordt ook gebruikt als glijmiddel, maar in combinatie met isoniazide functioneert het niet zo goed als magnesium stearate.

Gesproeidroogd isoniazide zonder hulpstoffen resulteert in deeltjes die te groot zijn voor pulmonaire toediening. De poeders zijn na sproeidrogen meteen volledig kristallijn. Deeltjes gemeten in de luchtstroom tijdens het sproeidroog-proces laten wel de verwachte deeltjesgrootten zien. Het is dus waarschijnlijk dat fusie tussen deeltjes plaatsvindt in de collector waar de deeltjes tegen elkaar aanliggen tijdens het kristalliseren.

De toevoeging van 5% L-leucine (w/w) voorkomt het fuseren van deeltjes en de geproduceerde deeltjes zijn geschikt voor pulmonaire toediening. Bovendien past 50 mg van deze formulering in de inhalator, wat de nominale dosis verdubbelt. Over L-leucine is bekend dat het verrijkt aan de oppervlakte van druppeltjes tijdens het sproeidrogen, waar het een coat vormt wanneer deze druppeltjes opdrogen tot deeltjes. Deze L-leucine coat voorkomt dat de isoniazide kernen met elkaar kunnen fuseren tijdens het kristalliseren. Helaas is de stabiliteit slecht. Wanneer het wordt blootgesteld aan vocht, fuseren de deeltjes weer samen. Dit komt waarschijnlijk doordat delen van de deeltjes oplossen en dan weer uitkristalliseren.

In een poging om de stabiliteit van de formulering beschreven in hoofdstuk 3 te verhogen is de leucine coat geoptimaliseerd in **Hoofdstuk 4**. Leucine staat erom bekend dat het vochtbescherming kan geven, wat mogelijk het oplossen en dan uitkristalliseren van deeltjes kan voorkomen of vertragen. De leucine coat verbeteren wordt bewerkstelligd door het optimaliseren van de hoeveelheid hulpstof die gebruikt wordt, door het optimaliseren van de sproeidroog parameters, en door het optimaliseren van de hulpstof zelf. Gezien voor hoog gedoseerde farmaca het minimaliseren van de hoeveelheid hulpstof van groot belang is, is bij het optimaliseren van de hoeveelheid hulpstof vooral gekeken naar het verlagen ervan, zelfs als het verhogen een betere stabiliteit kon geven. Het optimaliseren van de sproeidroog parameters heeft een aanzienlijke invloed op de L-leucine coat. Deeltjes geschikt voor inhalatie worden alleen geproduceerd bij inlaattemperaturen van 120 °C en meer. Een verhoging van de stabiliteit wordt alleen niet behaald.

Het veranderen van de hulpstof L-leucine naar trileucine verhoogt de stabiliteit aanzienlijk. Poeders kunnen nu voor minimaal drie maanden bewaard worden, zelfs wanneer ze worden blootgesteld aan luchtvochtigheden van 75%. De fysisch-chemische eigenschappen van trileucine resulteert in een betere coat. Echter, het verklaart niet de verbetering in stabiliteit. Isoniazide met trileucine poeders die een slechtere coat hebben dan isoniazide met L-leucine poeders zijn toch stabiel. Dit effect komt waarschijnlijk door het verschil in vaste vorm tussen trileucine en L-leucine. L-leucine is kristallijn na het sproeidrogen, terwijl trileucine amorf is. Hoe zich dit precies vertaalt in de behaalde resultaten, is nog onbekend.

De formulering van isoniazide met 3% trileucine (w/w) wordt goed gedispergeerd door de Twincer® inhalator, maar de retentie is hoog en variabel. Een ander ontwerp, de Cyclops®, behoudt de goede dispergeerbaarheid, maar verlaagt en stabiliseert de retentie. Verder kan door de trileucine de nominale dosis van 50 mg naar 80 mg verhoogd worden.

Tot zover zijn alle metingen uitgevoerd met manueel gevulde inhalatoren. In **Hoofdstuk 5** wordt de geschiktheid van een vacuüm trommel vuller bepaald voor het automatisch vullen van inhalatoren. We hebben laten zien dat de geoptimaliseerde isoniazide formulering en een amikacine formulering, precies en accuraat uitgevuld kunnen worden met de Omnidose vacuüm trommel vuller. Automatisch uitvullen van amikacine moet in een droge omgeving plaatsvinden, omdat anders agglomeraten vormen in het poederbed, wat de precisie en accuraatheid negatief beïnvloed. De dispergeerbaarheid van de automatisch uitgevulde poeders is vergelijkbaar met de manueel uitgevulde poeders, de retentie neemt wel af.



Dispersie van het poeder dient plaats te vinden in de eerste 0,5 tot 1,5 liter geïnhaleerde lucht. Amikacine wordt gedispergeerd in de eerste 0,9 tot 0,6 liter met een nominale dosis van 57 mg bij 4 en 6 kPa. Isoniazide, met een nominale dosis van 55 mg, wordt aanzienlijk sneller gedispergeerd. Bij 4 en 6 kPa vindt dispersie plaats in 0,18 liter lucht. Het is dus waarschijnlijk dat hogere doses gedispergeerd kunnen worden in de eerste 0,5 tot 1,5 liter. De hoogst geteste nominale dosis in een vergroot doseercompartiment was 150 mg. Dit resulteert in een fijne deeltjes dosis van  $107,35 \pm 13,52$  mg. Het wordt gedispergeerd in 0,39 liter. Kortom, automatisch vullen kan precies en accuraat gedaan worden, het verhoogt de emissie van de dosis en hogere nominale doses kunnen worden gedispergeerd.

In **Hoofdstuk 6** wordt een immunoassay voor het bepalen van amikacine concentraties in serum geoptimaliseerd voor gebruik bij een aankomende klinische studie. Door het lokaal toedienen van farmaca via de pulmonaire route worden lagere serum concentraties verwacht. De standaard assay heeft een ondergrens van 2,0 mg/L, wat waarschijnlijk te hoog is voor het bepalen van amikacine in serum na inhalatie. Om de ondergrens te verlagen en de sensitiviteit van het assay te verhogen, is het monster volume verhoogd van 3  $\mu$ L naar 35  $\mu$ L. Verder zijn reagens volumina voor R1 en R2 verlaagd van 250  $\mu$ L en 70  $\mu$ L naar 95  $\mu$ L en 30  $\mu$ L. Deze methode is gekalibreerd en gevalideerd volgens de HPLC eisen van de EMA en FDA. Validatie monsters met concentraties van 0,05 mg/L, 0,20 mg/L, 0,45 mg/L, 0,90 mg/L en 1,35 mg/L hadden allemaal hun systematische fout, algemene variatiecoëfficiënt, variatiecoëfficiënt in een sessie, en variatiecoëfficiënt tussen sessies binnen de eisen. De variatiecoëfficiënten van het 0,03 mg/L validatie monster waren buiten de eisen. De ondergrens is dus 0,05 mg/L. Extra validatie

betreffende hemolytisch, icterisch, en lipemisch serum en betreffende kruisreactiviteit met andere TB antibiotica moet worden uitgevoerd om de robuustheid van deze assay te bepalen.

## **A.3** **CURRICULUM VITAE**

Imco Sibum was born on the 9th of December 1991 in Meppel, the Netherlands. He graduated in Medical Pharmaceutical Sciences at the University of Groningen in 2015, completing two research projects. His first research project was performed at the department of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy where, under the supervision of Prof. H.W. Frijlink and Dr. N. Grasmeijer, he determined the applicability of the 3D print process for the production of controlled release implants. He performed his second research project at the department of Biotechnology and Molecular Medicine of the University of Eastern Finland. Here he spent eight months researching myocardial hibernation in a mouse model of type 2 diabetes, under the supervision of Dr. E. Gurzeler. After obtaining his master degree he continued in pharmaceutical sciences and started his PhD project within the Pharmaceutical Technology and Biopharmacy department of Prof. H.W. Frijlink. In this project he investigated the pulmonary delivery of high dry powder doses of antibiotics, aimed to counter resistance routinely encountered during treatment of tuberculosis.

## Publications

- Sibus, I.; Hagedoorn, P.; Botterman, C.O.; Frijlink, H.W.; Grasmeijer, F. Automated Filling Equipment Allows Increase in the Maximum Dose to Be Filled in the Cyclops® High Dose Dry Powder Inhalation Device While Maintaining Dispersibility. *Pharmaceutics* 2020, 12, 645.
- Sibus, I.; Hagedoorn, P.; Kluitman, M.P.G.; Kloezen, M.; Frijlink, H.W.; Grasmeijer, F. Dispersibility and Storage Stability Optimization of High Dose Isoniazid Dry Powder Inhalation Formulations with L-Leucine or Trileucine. *Pharmaceutics* 2020, 1, 14.
- Sibus, I.; Hagedoorn, P.; Frijlink, H.W.; Grasmeijer, F. Characterization and Formulation of Isoniazid for High-Dose Dry Powder Inhalation. *Pharmaceutics* 2019, 11, 233.
- Sibus, I.; Hagedoorn, P.; de Boer, A.H.; Frijlink, H.W.; Grasmeijer, F. Challenges for pulmonary delivery of high powder doses. *Int. J. Pharm.* 2018, 548, 325–336.

## Oral presentations

- Formulating isoniazid for high dose dry powder inhalation. 5th INTERNATIONAL TB-MEETING. Groningen, the Netherlands, August 26, 2019
- Optimizing the dry powder isoniazid formulation for pulmonary administration. PHARMACY DAY. Groningen, the Netherlands, June 11, 2019
- Formulating isoniazid for dry powder inhalation. MEDISCHE AEROSOL DENKTANK. Utrecht, the Netherlands, March 14, 2019
- Amikacin dry powder for pulmonary delivery in tuberculosis patients. PHARMACY DAY. Groningen, the Netherlands, June 12, 2018
- Yin and yang: the simultaneous development of device and formulation. SIMINHALE COST ACTION MP1404 workshop 'Particle Engineering and Device Development for Pulmonary Drug Delivery: What is new?'. Belgrade, Serbia, February 28, 2018
- The formulation of isoniazid for dry powder inhalation: How understanding the physicochemical properties helps the formulating process. PHARMACY DAY. Groningen, the Netherlands, June 7, 2016

### Poster presentations

- Optimisation of an isoniazid dry powder formulation for pulmonary administration. DRUG DELIVERY TO THE LUNGS (DDL). Edinburgh, United Kingdom, December 11 – 13, 2019.
- Formulating amikacin for dry powder inhalation. DRUG DELIVERY TO THE LUNGS (DDL). Edinburgh, United Kingdom, December 12 – 14, 2018.
- Formulating amikacin for dry powder inhalation. MEETING OF THE BELGIAN-DUTCH BIOPHARMACEUTICAL SOCIETY. Leiden, the Netherlands, November 23, 2018.
- Formulating isoniazid for dry powder inhalation by spray-drying. DRUG DELIVERY TO THE LUNGS (DDL). Edinburgh, United Kingdom, December 6 – 8, 2017.
- Characterisation of jet-milled and spray-dried isoniazid for pulmonary administration. DRUG DELIVERY TO THE LUNGS (DDL). Edinburgh, United Kingdom, December 7 – 9, 2016.
- Characterisation of jet-milled and spray-dried isoniazid for pulmonary administration. MEETING OF THE BELGIAN-DUTCH BIOPHARMACEUTICAL SOCIETY. Utrecht, the Netherlands, November 24, 2016.

### Other

- Part of the team responsible for the hydroxychloroquine clinical trial (worked on formulating hydroxychloroquine, on clinical trial documentation, on setting up production, and on the trial itself).
- Part of a four-man team responsible for the introduction of the digital lab journal.
- Part of the team responsible for performing the amikacin clinical trial.
- Set up GMP production and executed production for amikacin clinical trial.
- Wrote clinical documentation (protocol, IMPD, IMDD, IB, D3) for amikacin clinical trial.



## A.4 DANKWOORD

Sla een willekeurig PhD 'boekje' open en je zult het vinden: het dankwoord. Niet het meest wetenschappelijke deel maar waarschijnlijk wel het meest gelezen. Ook niet compleet onterecht, want ik heb het namelijk niet in mijn eentje gedaan. De volgende mensen wil ik graag bedanken voor de leuke, interessante en leerzame tijd.

Mijn promotor, prof. dr. Henderik Willem Frijlink. Beste Erik, tijdens mijn studententijd werd je, na acht keer tweede te zijn geworden, een keer eerste bij de 'Docent van het jaar' verkiezing. Ik had natuurlijk op je gestemd, wat denk ik een belangrijke reden is geweest waarom ik bij jou mocht komen promoveren? Wat de reden ook is geweest: mijn dank is groot dat je me de kans geboden hebt. De vrije keuze die je me gaf in het kiezen van mijn onderwerp, samen met de daaropvolgende mogelijkheden om zelfstandig te werken en om congressen/summerschools/etc. te volgen in het buitenland, worden zeker gewaardeerd. In een poging om een tegenprestatie te leveren heb ik je ~~non-stop~~ vaak regelmatig zo nu en dan geholpen met je laptop. Ik hoop dat hij nu wat betrouwbaarder is.

Ook mijn copromotor, dr. Floris Grasmeijer, heeft het een en ander voor mij betekend. Beste Floris, jij was mijn ingang in de inhalatietechnologie wereld en hebt mij de technieken, procedures, analyses, en al het andere bijgebracht wat ik nodig had. Verder kwam ik via jou ook bij PureIMS terecht, waar we de productie voor de amikacine klinische studie gedaan hebben. De klinische studie is niet in mijn thesis terecht gekomen, maar toch vond ik het erg leerzaam en interessant om te doen en ben ik blij dat we daaraan gewerkt hebben. Nu hebben we elkaar niet alleen tijdens werk gezien, maar ook verschillende keren

daarbuiten, waarvan het wadlopen wel echt een hoogtepunt was. Ik hou me graag aanbevolen voor een volgende tocht.

Paul Hagedoorn, net als Floris heb je me alles bijgebracht wat een inhalatietechnoloog hoort te kennen. Je was altijd erg gedetailleerd en kwam met verhalen waarom sommige beslissingen genomen waren. Dit maakte het voor mij altijd heel logisch en makkelijk te onthouden waarom bepaalde handelingen op die specifieke manier moeten gebeuren. Verder was je regelmatig bij de besprekingen aanwezig die vaker wel dan niet compleet ontspoorde door het toedoen van een bepaald iemand die ik niet zal noemen. Hoewel ze soms ontspoorde kwam ik er wel altijd met nieuwe inzichten weg, daarvoor dank.

Anko Eissens, elke keer als er iets kapotging kwam ik bij jou weg met een schroevendraaier en een vrijbrief om een poging te wagen. Door jou ben ik vertrouwd geraakt met de kunst van het sleutelen en apparaten die anders een black box waren gebleven, werden een stuk begrijpelijker. Koffie op jouw kantoor was ook nooit verkeerd.

Anne Haaije de Boer, bedankt voor de hulp bij het schrijven van het review en de mooie en verduidelijkende getekende figuren daarin.

Mijn ouders, zonder hun had ik überhaupt nooit kunnen beginnen aan mijn studie, wat de fundering is geweest voor dit promotietraject. Ook de weekenden in 'hotel Schoonebeek' waren essentieel om op te laden om er daarna weer vol tegenaan te gaan.

Nienke Sibum, mijn kleine zusje. Al voordat ik begonnen was aan mijn promotietraject stond vast dat jij één van mijn paranimfen zou



worden. Bij elke uitreiking die ik ooit heb gehad mocht jij naar afloop oppassen op mijn diploma. Het is een gegeven dat jij nu hetzelfde mag doen.

Rick Lugers, voor het maken van de cover en voor het lay-outen van het binnenwerk. Door jou ziet het eruit als een echt boekje, in plaats van een Word-document geprint op A5-formaat.

De oude en nieuwe bezetting van 207 (oude: Naomi en Max, nieuwe: Annemarie en Max): betere kantoorgenoten kun je niet vinden. Er was altijd tijd voor discussies en suggesties over werk en tijd om te ouwehoeren. Verder hebben we elkaar regelmatig buiten de kantooruren gezien, was het niet om Star Wars te kijken, dan was het wel om te sporten, bordspelletjes te doen of om te eten. Annemarie en Max, ik kijk er naar uit om jullie boekjes te mogen ontvangen. Max, we zijn tegelijk begonnen aan het eindtraject, waar we elkaar over en weer hielpen met het uitvogelen van wat er allemaal gedaan en geregeld moest worden. Ik vind het mooi dat we dat traject afsluiten met jou als mijn paranimf.

De medewerkers van PureIMS (Reinier Schwietert, Jan-Willem Puttenstein, Wouter Dijkstra, Truus van den Bos, Marcel Hoppentocht), bij jullie kwam ik terecht voor de klinische productie van de amikacine inhalator. Het opzetten van de productie, het valideren, het uitvoeren en het regelen van de vrijgave was wel wat werk, maar waar ik veel van geleerd heb. Het was interessant om een uitstapje te kunnen maken in de farmaceutische industrie, waar het er overduidelijk anders aan toe gaat dan op een universiteit. Ik hoop dat jullie wat hebben aan mijn formuleringen en opgestelde documenten.

During my time in the department I had the privilege to teach a few students about inhalation technology, some even multiple times. Abhimata Paramanandana, Mark Kluitman, Charlotte Johnson, Martijn Kloezen, Sofie Vermander, Dennis Berends, Carel Botterman, Achraf Naimi, Kyong Mun, Bram Kamerbeek, Joost Mulder, you all delivered, with even some data ending up in published articles. I hope you all had fun and that I managed to showed you the ropes of inhalation research. I want to thank you all for your enthusiasm and contributions to my research projects.

I would like to thank the assessment committee consisting of Prof. F. Picchioni, Prof. T.S. van der Werf, and Prof. M. Yang for their time and willingness to review this thesis.

Albert-Jan Voerman, dr. Jan-Willem Alffenaar en prof. dr. Daan J. Touw, bedankt dat jullie mij de mogelijkheid gaven om betrokken te zijn bij de amikacine analyse optimalisatie studie. Het gaf me extra inzicht in de benodigdheden voor een klinische studie, en hoeveel specialisten bij elkaar moeten komen om van zo'n klinische studie een succes te maken.

Dr. Onno Akkerman, samen hebben we gewerkt aan de klinische studie documentatie voor de amikacine trial. Net als tijdens mijn tijd bij PureIMS was dit even wat anders, maar zeker net zo interessant en leerzaam om te doen. Hoewel de studie, jammer genoeg, te laat van start is gegaan om in mijn thesis terecht te kunnen komen, ben ik blij dat het ondertussen begonnen is en dat ik er een paar keer bij heb kunnen zijn. Het is natuurlijk geweldig om een product wat je geformuleerd hebt, waar je aan meegeholpen hebt om een assay voor op te zetten en waar

je de productie voor hebt uitgevoerd, succesvol toegediend ziet worden bij een patiënt. Dank daarvoor.

Let me finish by thanking the people of the PTB department, who I shall not list in fear of missing someone. You made it the nice and stimulating work environment that it is. Not only during the Pharmacy outings, department outings, the PhD weekend, or the all so important 'vrijdagmiddagborrels' did we have fun together, but also during working hours. I hope that conditions are so that we will be able to celebrate this occasion together.



*Appendix: Dankwoord*